

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16698

研究課題名(和文)水素ガス、ヘリウムガス吸入の腎虚血再灌流における腎保護作用

研究課題名(英文)Protective effects of hydrogen gas and helium gas inhalation for kidney ischemia/reperfusion in mice.

研究代表者

丸山 雄樹 (Maruyama, Yuki)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：00803850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：腎虚血再灌流障害は腎移植の成績に重大な影響を与える合併症である。近年、水素の抗酸化作用が注目され、虚血再灌流障害の軽減に有効と報告があるが、ガス吸入による腎保護作用は不明である。ヘリウムについても虚血再灌流障害での保護作用は同じく不明であり、今回各々のガス吸入による腎保護作用を検討した。

マウス腎虚血再灌流障害モデルを作成し、各群の腎障害の程度を検討したが、水素ガス、ヘリウムガス吸入による明確な腎保護作用は確認できなかった。虚血再灌流障害は、体温や虚血時間が重要であり、それらの条件を変えて行ったが同様であった。今後は、ガスの組成濃度を変えた検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎虚血再灌流は、腎移植のみならず、腎血流の減少を来たす広範囲な疾患に影響を及ぼす重大な病態である。現状、対症療法しかなく、新たな治療法の開発が急務である。本申請研究により、1.3%という比較的低濃度の水素ガス、ヘリウムガス吸入で明らかな腎保護作用を確認できなかったという結果は、新知見であり、腎虚血再灌流障害の機序の解明に役立つと考えられる。今後、ガスの組成濃度を変えた研究を推進することにより、さらなる治験が得られることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Renal ischemia/reperfusion injury is a complication that has a significant impact on the outcome of renal transplantation. Recently, the antioxidant effect of hydrogen has attracted much attention and has been reported to be effective in reducing ischemia/reperfusion injury. However, the renal protective effect of hydrogen gas inhalation is unknown. The protective effect of helium gas in ischemia-reperfusion injury is also unknown. In this study, we investigated renoprotective effect of each gas inhalation.

A mouse model of renal ischemia-reperfusion injury was used and the extent of renal injury in each group was examined. However, no clear renoprotective effect of hydrogen or helium gas inhalation could be confirmed. In ischemia/reperfusion, body temperature and ischemia time are important. We examined them under different conditions and similarly found no clear renoprotective effects. In the future, the compositional concentration of the gas needs to be changed for further study.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：虚血再灌流障害 腎移植 水素ガス ヘリウムガス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

末期腎不全の治療法として透析療法と腎移植の2種類があるが、日本では透析患者約32万人に対して2015年の一年間で腎移植は合計1661例のみである。腎移植は透析患者のQOLの大幅な向上や透析と比べた医療費を軽減効果から、数少ない腎提供を最大限に生かす工夫が必要である。その中でも、腎虚血再灌流は移植手術の際に必発の合併症であり、腎移植の成績に大きな影響を及ぼす。再灌流により、虚血に陥っていた血管内皮細胞はTNF-aやIL-1といったサイトカインを数分間の間に数多く産生し、好中球やマクロファージの遊走因子であるIL-8, CXCL1/KC, CXCL2/MIP-2, CCL2/MCP-1を産生する。こうして浸潤した好中球やマクロファージは細胞障害性サイトカインや酸素派生物質を産生し組織の障害を引き起こす。これまでの研究で、虚血時間と好中球走化因子であるIL-8が相関関係にあることを明らかにし、動物モデルにおいて好中球浸潤を阻害することによって組織障害が緩和されることが明らかになっている。

水素に関しては脳の虚血再灌流障害の緩和が可能な事が2007年に報じられて以後、抗酸化作用の機序が研究されてきた。虚血状態が続いた細胞に酸素が再供給されると、スーパーオキシドが大量に発生し、活性酸素種の中でも毒性の高いヒドロキシラジカル( $\cdot\text{OH}$ )となり細胞を傷害する。水素分子( $\text{H}_2$ )はその $\cdot\text{OH}$ と反応し( $\cdot\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{H}\cdot + \text{H}_2\text{O}$ )、毒性を打ち消す事で細胞死を抑制する。水素は分子量が最も低い無極性分子であり、生体内で拡散力が強く、血流の先の疾患部位まで到達可能であり、心臓、脊髄、肝臓などの臓器で虚血再灌流傷害を抑制する事が確認されていた。しかし、腎臓領域においては、水素水の点滴による報告はあるものの、ガス吸入は、造影剤により誘発される腎障害に対して腎障害を軽減したという報告があるのみである。ヘリウムにおいてはその吸引の効果の報告が少なく、喘息やCOPDなどの気道障害を持つ患者において酸素化を改善するとう報告があるのみである。ヘリウムも分子量の非常に小さい分子であり、生体内への拡散力が強いと考えられ、虚血再灌流障害における保護作用の有無の検証を進める必要がある。

### 2. 研究の目的

腎虚血再灌流障害は腎移植患者の予後に影響を与える重大な病態であるが、治療法は対症療法しかないのが現状であり、新たな治療法の開発が求められている。水素は抗酸化作用を持ち、吸入、飲水による抗炎症作用が報告されている。また、ヘリウム吸入は気道障害の患者において酸素化の改善の報告がある。しかしいずれのガスも、腎虚血再灌流における役割は明らかでない。本申請研究では、マウス腎虚血再灌流モデルを用いて、“水素ガス、ヘリウムガスが腎虚血再灌流障害を軽減する”という仮説の実証を目的とした。本実験で扱う水素ガスとヘリウムガスの濃度は1.3%と低濃度であり、移植時に麻酔下においても患者に負担なく吸引させることができる等、安全な臨床応用が比較的容易に見込めるという利点がある。将来的には腎移植術だけでなく、腎部分切除術や急性腎不全などの血流障害を来す広範な疾患への応用を見込み、有用性の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

今回の研究の仮説は、“水素ガス、ヘリウムガスが腎虚血再灌流障害を軽減する”であり、各々のガス吸入による腎虚血再灌流障害における腎保護作用の有無、及び程度の検証を目的とした。マウス腎虚血再灌流モデルとして、8-12週の雄性C57BL/6マウスを用いて、麻酔下に左右腎動脈を一括クランプし、両腎動静脈を開放した。術中は、電灯・heatpadにより腹腔内温度を一定に保った。処置後は閉鎖ケージで最大72時間経過観察を行った。ガス投与群に対しては、水素ガス群が酸素21%+窒素77.7%+水素1.3%、ヘリウムガス群は酸素21%+窒素77.7%+ヘリウム1.3%の組成を用いて、再灌流障害の誘導中、ガスチャンパーに入れ、1匹あたり1L/minの流量で流した。コントロール群に対しては、窒素79%+酸素21%を同様の流量で吸入させた。腎機能評価は、24, 24, 72時間と群ごとに血清クレアチニンを測定した。腎組織は各時点で採取され、パラフィン切片のHE染色を行い、組織障害の差を近位尿細管に注目し、尿細管障害をスコア化し比較検討した。虚血再灌流障害において障害の増悪に、好中球が主要な役割を担うことがこれまでの研究でわかっている。好中球浸潤の程度の差を比較するために、腎組織はさらに、凍結切片とし、Antimouse Ly-6G monoclonal antibody (RB6-8C5)を用いて好中球の免疫染色を行った。

### 4. 研究成果

8-12週の雄性C57BL/6マウスを、虚血なし群、虚血再灌流+air吸入群、虚血再灌流+水素ガス吸入群、ヘリウムガス吸入群に分け、比較検討を行った。腎虚血再灌流の誘導は、両腎動静脈クランプ時間45分、腹腔内体温37℃でガスチャンパー管理下に行った。各種ガスの濃度は上記の通りの組成および流量を用いた。

虚血なし群と比較すると、いずれの虚血再灌流あり群においても腎機能の増悪、尿細管障害の増悪、免疫染色での好中球浸潤の増悪を認めた。しかし、air吸入群、水素ガス吸入群、ヘリウ

ムガス吸入群間では、水素ガス吸入群で、若干の腎機能障害低下、組織障害の軽減傾向を認めるのみで、明らかな差を確認できなかった。腎虚血再灌流は、虚血時間、虚血中の体温、侵襲によって腎障害の程度に影響が出ることが知られている。そのため、この結果を踏まえ、様々な状況下でガス吸入の腎保護作用の有無を検証した。まずは、より侵襲を少なくするために、正中切開での開腹を両側の腰部斜切開に変更した。また、虚血時間 45 分、腹腔内体温 37℃ では障害が強すぎると判断し、虚血時間 30 分腹腔内体温 37℃ 虚血時間 45 分腹腔内体温 32℃ 虚血時間 30 分腹腔内体温 32℃ と条件を変え、それぞれで、ガス吸入による障害の軽減の有無を検討した。しかし、いずれの条件においても、ガス吸入による明らかな腎保護作用は確認できなかった。続いての問題点として、ガス吸入が不十分である可能性を考えた。そのため、ガスチャンバー内に 1 匹あたり 1L/min の流量でガスを流す方法から、マウス用のマスクにガスを接続し、吸入させる方法でも検討を行った。その検討でも同様に、明確な腎保護作用は発揮されなかった。

昨今、水素の抗酸化作用の注目は高まっており、虚血再灌流モデルにおいても報告が散見されるが、今回の研究では、ガス吸入による明確な腎保護作用は発揮されなかった。ヘリウムガスは吸入による報告自体ほぼ無く、今回新たに検討を行ったが、こちらも同様であった。今後への課題として、今回用いたガスの濃度は、安全性なども考慮された、1.3%と比較的低濃度のものであった。虚血再灌流の条件を体温、虚血時間、ガス吸入法を変えて検討を行ったが、ガス濃度に関しては、変更しておらず、より高濃度の組成を用いることで、腎保護作用を発揮する可能性は考えられた。適切な濃度に関しては、さらなる研究を推進し、解明していく必要があることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸山 雄樹
2. 発表標題 腎虚血再灌流障害における好中球動態の2光子励起顕微鏡を用いた解析
3. 学会等名 2019年日本移植学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----